

## 脱窒菌のコロイド化学的性質

鷲谷亜希子<sup>1</sup> 平井 俊朗<sup>2</sup> 林 剛<sup>3</sup>✉

帝京科学大学大学院理工学研究科<sup>1</sup> 帝京科学大学生命環境学部生命科学科<sup>2</sup>

帝京科学大学生命環境学部環境科学科<sup>3</sup>

(平成 20 年 12 月 19 日受理)

### Colloid Chemical Properties of Some Denitrifiers

Akiko WASHIYA<sup>1</sup> Toshiaki HIRAI<sup>2</sup> Tsuyoshi HAYASHI<sup>3</sup>

In order to elucidate the effects of the solutes contained in waste waters; inorganic electrolytes and organic compounds, on the flocculation behavior and the denitrifying function of the denitrifiers that are employed in the biological denitrifying processes at the water purification plants. In the study, three kinds of denitrifiers which were gathered and cultured in Uenohara City, Yamanashi Prefecture; *Pseudomonas aeruginosa* (a bacillus with flagella), *Alcaligenes* sp (a bacillus with flagella), and *Paracoccus* sp (a bacillus without flagella) were used. Every denitrifier is Gram-negative and is negatively charged. Flocculation effects of inorganic electrolyte against the negatively charged bacterium sols followed the *Shulze-Hardy* rule. Among the inorganic ions, trivalent cations such as  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$  caused strong flocculation. Some cationic organic matters such as Methylene Blue (a cationic dye) and benzalkonium chloride (a cationic detergent) adsorb on the cell surface by electrostatic force of attraction, resulting in the bacterium flocculation and also the extinction of the denitrifiers themselves by the well-known their action of disinfectant. As a result, under the conditions in waste waters in which higher the dispersibility of the denitrifiers, better the denitrifying function act with a high denitrifying rate.

**Key words :** 硝酸イオン除去, 脱窒菌, 脱窒機能, 凝集-分散, 細胞表面, removal of nitrate, denitrifier, denitrifying function, flocculation-dispersion, cell surface

### 1. はじめに

発ガン性や酸素欠乏症の発症などヒトの健康への悪影響が懸念される硝酸イオンは, 世界保健機関 (WHO) の国際水質基準において硝酸性窒素 ( $NO_3-N$ ) が  $50mg/dm^3$ , 日本の水質環境基準では硝酸性窒素および亜硝酸性窒素 ( $NO_2-N$ ) は  $10mg/dm^3$  以下に設定されている。また「人の健康の保護に関する基準」では飲料水中の硝酸性窒素, 亜硝酸性窒素の合計が  $10mg/dm^3$  以下に, 更に「排水基準」の硝酸性窒素, 亜硝酸性窒素, アンモニア性窒素 ( $NH_3-N$ ) の合計は  $100mg/dm^3$  以下にそれぞれ規制されている<sup>1)</sup>。

人体への悪影響が問題視される排水中の硝酸イオンを除去する方法として, イオン交換樹脂法, イオン交換膜法, 電気透析法などの物理化学的脱窒法や, 微生物による硝酸の脱窒作用を利用する生物学的脱窒法などがある。特に生物学的脱窒法は環境負荷が小さく経済的にも有効であると期待されている<sup>2)</sup>。

ところで, 脱窒菌は大きさが約  $1\mu m$  のコロイド粒子の範疇にあり, 海水や地表水中並びに污水处理場などの水質環境において界面現象の影響を大きく受けると考えられている<sup>3)</sup>。本研究では山梨県上野原市で採取・培養した脱窒菌について, 排水中に

溶存する無機・有機電解質成分が脱窒菌の分散・凝集挙動に対する影響を調べ、脱窒菌の脱窒効率との関連を検討した。

## 2. 脱窒菌および実験方法

### 2-1. 脱窒菌試料

脱窒菌は、帝京科学大学林研究室のサケ科魚類飼育水槽の底砂利から採取し<sup>4)</sup>、嫌気条件で繰り返し培養を重ね、最終的に平面寒天培地でコロニー状に単離し、同定した<sup>5)</sup> *Pseudomonas aeruginosa* (以後脱窒菌①とする)、*Alcaligenes sp* (同脱窒菌②)、*Paracoccus sp* (同脱窒菌③) の3種をそれぞれ使用した。図1に示すように、脱窒菌①は約  $1.3\mu\text{m} \times 0.8\mu\text{m}$  の桿状菌で鞭毛を有し、同様に脱窒菌②は約  $1.3\mu\text{m} \times 0.5\mu\text{m}$  の桿状菌で鞭毛を有する。一方、脱窒菌③は直径約  $0.6\mu\text{m}$  の球菌である。これらはいずれもグラム陰性菌である<sup>5)</sup>。

これら脱窒菌試料を、表1の組成で作製した平面寒天培地、および図2に示す Becton Dickinson and Company 製ガスパックシステム (脱酸素剤を入れた嫌気ジャー) を用いて、 $28^{\circ}\text{C}$ 、8~96h 培養により成長させたコロニーを以降の実験に使用した。

表1 平面寒天培地の組成.

・ 普通寒天培地	35 g	
寒天	15g	
肉エキス	5.0g	
ペプトン	10.0g	
塩化ナトリウム	5.0g	
・ 硝酸カリウム	4 g	
・ エタノール	8ml	

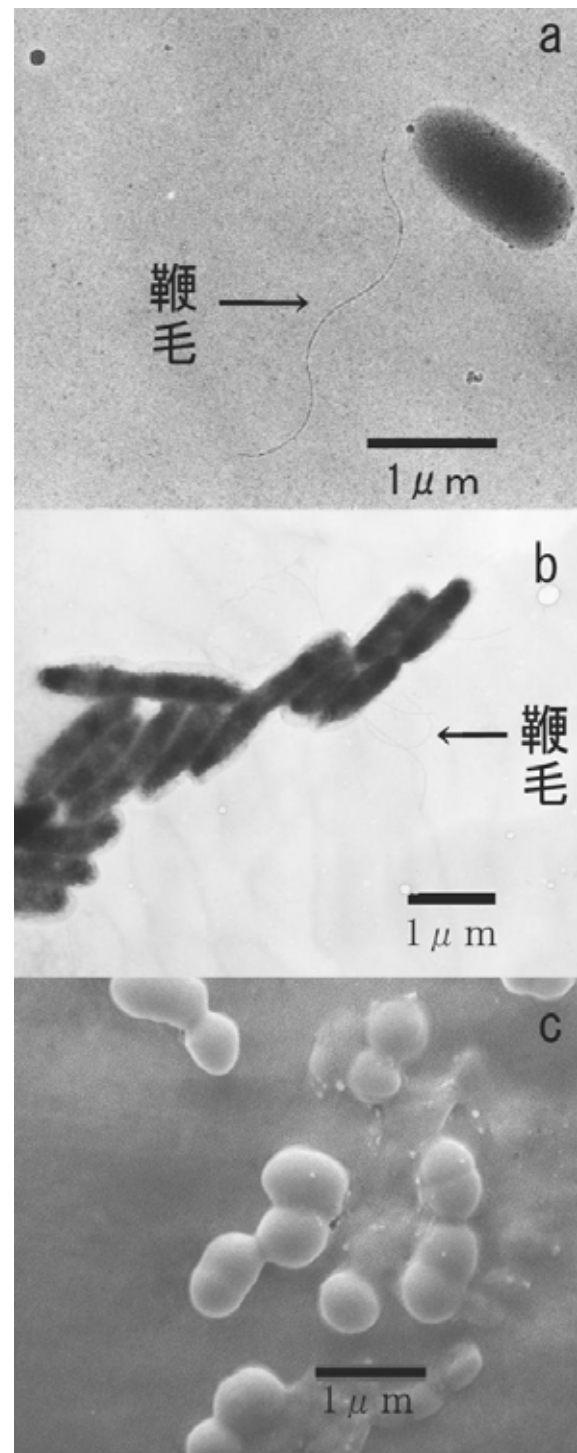


図1. 脱窒菌の形状. a: 脱窒菌① (透過型電子顕微鏡写真), b: 脱窒菌② (透過型電子顕微鏡写真), c: 脱窒菌③ (走査型電子顕微鏡写真).

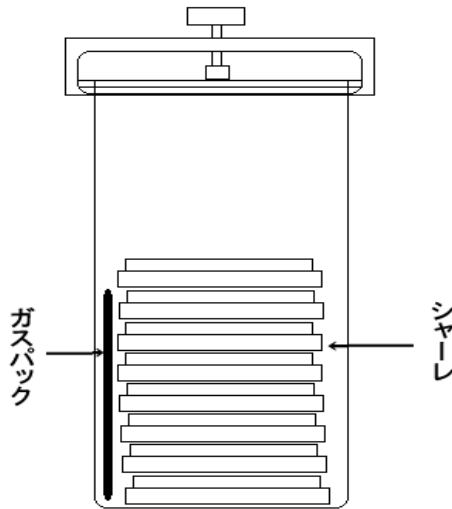


図2 培養装置

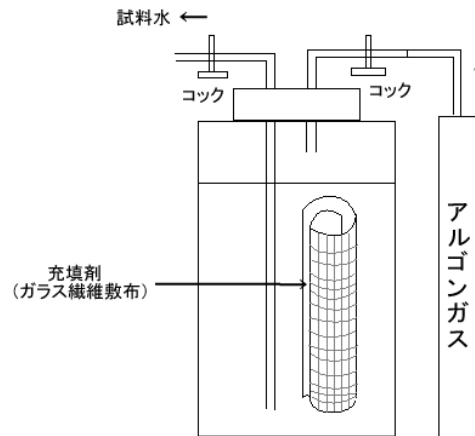


図3 脱室装置

## 2-2. 脱室実験条件

脱室実験は 30℃の嫌気性条件で行なった。図3に示すプラスチック製円筒器（高さ 20cm,  $\phi$  12.5 cm）に微生物担持層として旭硝子製 E ガラス繊維織布（30cm×30cm）を充填した装置を使用し、培養液は滅菌した水道水に  $\text{KNO}_3$  を加え  $\text{NO}_3^-$  イオン濃度を所定濃度に調整し、栄養源にはポリペプトン、炭素源にはエタノールを使用した。また、酸素置換にはアルゴンガスを用い、試水採取はアルゴンガス加圧によって行なった。脱室実験過程の試料水中の  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  濃度は DIONEX 製イオンクロマトグラフ測定装置 (DX-100) を用いて定量した。また pH 値は東亜製ガラス電極 pH メーター (HM-60S)、電気伝導度は東亜製伝導度計 (CM-60S)、酸化還元電位は東亜製イオンメーター (IM-40S) によりそれぞれ測定した。

## 2-3. 脱室菌の表面電荷の測定と分散性の観察

採取した各々の脱室菌コロニーに滅菌蒸留水を加え、遠心分離機を用い洗浄を 2 回繰り返した後、 $\text{HCl}-\text{NaCl}-\text{NaOH}$  系、 $\text{HNO}_3-\text{NH}_4\text{NO}_3-\text{NH}_3$  系、および  $\text{HNO}_3-\text{NaNO}_3-\text{NaOH}$  系でそれぞれの電気伝導度 (EC) を一定 (50, 10, 1, 0.5mS/cm) にした pH3~11 の懸濁液、または塩濃度 0~

0.2mol/dm<sup>3</sup> で pH 値を一定 (2.5, 3.5, 4.7, 6.0, 6.5, 7, 10.5) にした懸濁液を調整し、PEN KEN 社製 LAZER ZEE METER (Model 501) により印加電圧 100V で脱室菌の  $\zeta$  電位を測定した。また測定後に試料溶液の一部を寒天培地で培養し、コロニー生成状態を観察して脱室菌の生死を確認した。

前節に述べた様に洗浄した脱室菌を伝導度一定 (9.6mS/cm,  $\text{HCl}-\text{NaCl}-\text{NaOH}$  系) で pH が一連に異なる懸濁液を調製した。脱室菌濃度は 15g/dm<sup>3</sup> とした。これらの懸濁液をネスラー型比色管に移し、よく振り混ぜてから静置して分散状態の経時変化を観察した。次に各脱室菌懸濁液の  $\zeta$  電位を測定した後、同様に生死確認をした。

## 2-4. 無機塩類および陽イオン染料による凝集力の観察

培養後、洗浄した脱室菌を滅菌蒸留水に懸濁させた溶液を入れた沈降管に、所定量の無機塩類およびメチレンブルー陽イオン染料を添加して静置し、脱室菌の凝集状態を観察した。

## 2-5. カチオン界面活性剤による凝集力の観察

2-3 項と同様に培養、洗浄した脱室菌を用い、伝導度 500  $\mu\text{S}/\text{cm}$  ( $\text{HCl}-\text{NaCl}-\text{NaOH}$  系) pH7 の

懸濁液（脱窒菌濃度：15g/dm<sup>3</sup>）を調製した。懸濁液を沈降管に分注し、それぞれに塩化ベンザルコニウムを0～0.93%添加し、よく振り混ぜてから静置し、分散状態の経時変化を観察した。また、静置後の各懸濁液について脱窒菌の $\zeta$ 電位を測定した。測定終了後は、同様に脱窒菌の生存状態を確認した。

## 2-6. 脱窒菌の比表面積測定

2-3 項と同様に培養、洗浄した脱窒菌について、Brindley らによるメチレンブルー吸着法<sup>6)</sup>に従い脱窒菌の全比表面積を測定した。遠心分離機は島津理化製の多本架遠心分離機（SPN-400）、分光光度計は日本分光製の Ubest-35 型を使用し、波長665nmで測定した。上澄み液の色調がメチレンブルー自身の色調と異なる場合は約0.03gの塩化アンモニウムを加え、再度遠心分離した。

## 3. 結果および考察

### 3-1. 表面電荷と脱窒

硝酸態窒素の初濃度約1600mg/dm<sup>3</sup>の溶液について、脱窒による硝酸態窒素と亜硝酸態窒素の経時変化を図4に示す。硝酸態窒素が分解されるとともに亜硝酸態窒素が生成され、その後徐々に分解されている。硝酸態窒素は3種類の菌ともに8日目に検出できなくなった。亜硝酸態窒素については脱窒菌②が3種類の中で最も多く生成し、そしてなかなか減少しない傾向が見られ、脱窒菌によるNO<sub>3</sub><sup>-</sup>とNO<sub>2</sub><sup>-</sup>（mg/dm<sup>3</sup>）の脱窒量を脱窒処理41日めで比較すると、脱窒菌①が100%、脱窒菌③が99%に対し、脱窒菌②は92%となった。伝導度10mS/cmでの $\zeta$ 電位—pH曲線を図5に示す。10mS/cmは脱窒試験に用いた溶液の伝導度に近い値である。脱窒時のpHは約7～10であり、その時の $\zeta$ 電位は脱窒菌③、①、②の順に大きい結果となり、脱窒速度の早い脱窒菌は負電荷が大きく良好な分散性を示す事がわかった。この結果から分散性の高い脱窒菌は効率よく硝酸イオンや亜硝酸イオンと接触でき

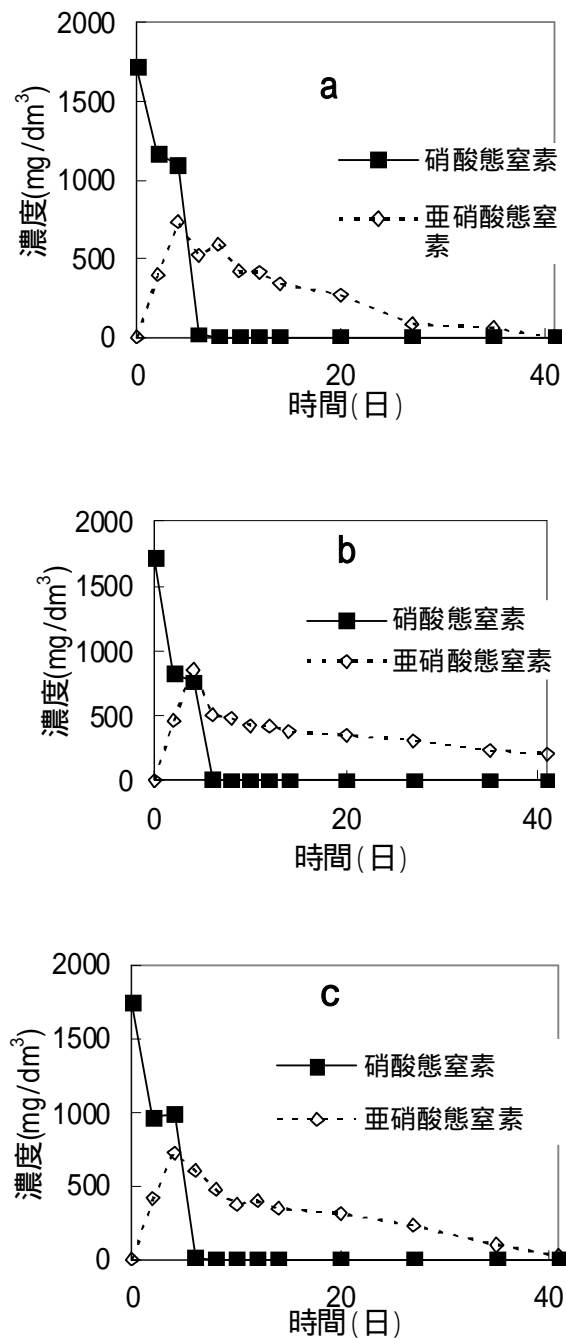


図4. 硝酸態窒素と亜硝酸態窒素の経時変化。硝酸態窒素初濃度約1600mg/dm<sup>3</sup>。

a：脱窒菌①，b：脱窒菌②，c：脱窒菌③

るため硝酸イオンと亜硝酸イオンの除去に有効であると考えられる。もしくは分散性の高い条件下である脱窒菌は脱窒速度が早くなるとも推測できる。

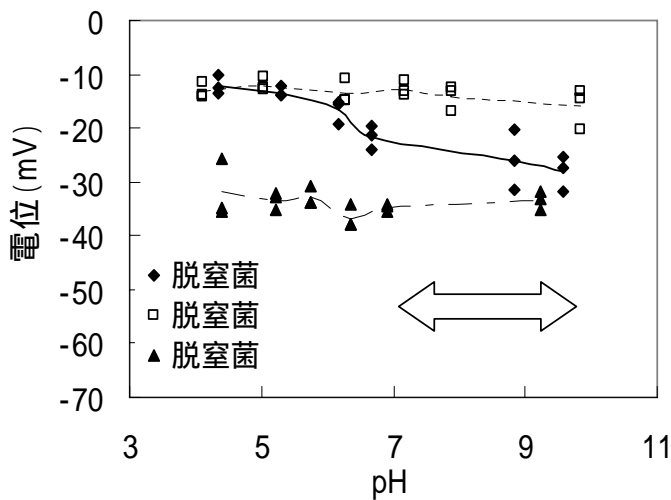


図5. 伝導度 10mS/cm でのと 電位—pH 曲線.HNO<sub>3</sub>-NaNO<sub>3</sub>-NaOH 系.

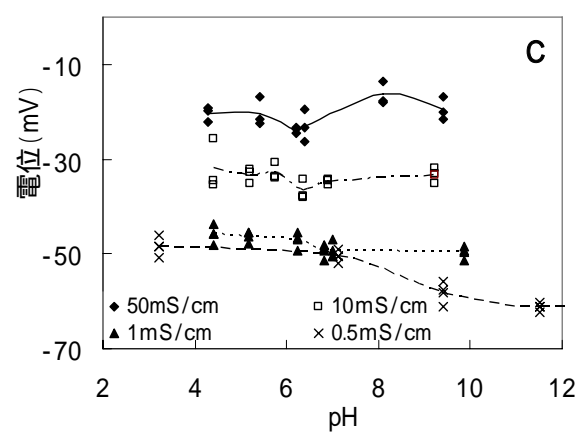
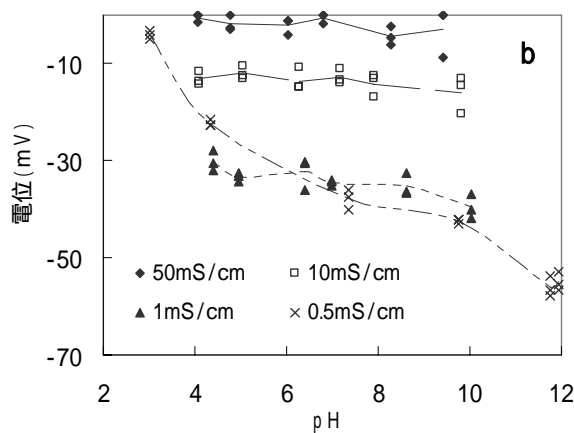
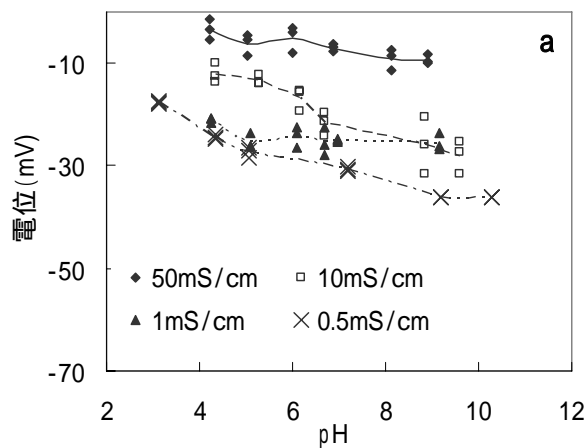


図6. 3種類の脱室菌のと 電位—pH 曲線. a: 脱室菌①, b: 脱室菌②, c: 脱室菌③  
HCl-NaCl-NaOH 系, 電気伝導度 (EC) 50, 10, 1, 0.5mS/cm.

### 3-2. 脱室菌の電荷と分散性

図6に示すように、3種類の脱室菌とも負に帯電し、電解質の濃度が小さいほど負の電位が大きいことがわかる。脱室菌①は酸性側にいくに従ってやや負の電荷が小さくなる。脱室菌②はEC 0.5mS/cmでpHによる影響が顕著であり、またEC 50mS/cmではと電位が非常に小さい。脱室菌③はpH3~7の条件下では電気二重層は厚く、pHによる影響は殆ど見られない。と電位の結果から3種類の脱室菌ともに等電点は強酸性側にあると推測される。分散試験(図7)より、脱室菌①の等電点は不明だが、脱室菌②の等電点はpH1.5付近、脱室菌③の等電点はpH2.0付近であると考えられる。脱室菌②は③と比較し、等電点より酸性側やアルカリ性で分散している点が異なっている。脱室菌③よりもpHによる変化が大きく正帯電になり、再び分散したのではないかと考えられる。生存については図8に示した。脱室菌①はpH1.5と2.3で小さいコロニーが一つできていたがpH2.5以上で生存する傾向が見られた。脱室菌②はpH2.5以上で生存する傾向が見られた。脱室菌③は電場をかけないものはpHが低くても生存しており、電場をかけたものはpH4以上で生存する傾向が見られ、また電場をかけたものより、かけないものの方が生存数が多い結果となった。

HNO<sub>3</sub>-NaNO<sub>3</sub>-NaOH の系での 3 種類の脱室菌

の  $\zeta$  電位 - pH 曲線を図 9 に示す。  
HCl-NaCl-NaOH の系と同様に pH3~7 の条件下ではマイナスに帯電している。伝導度 50, 10, 1, 0.5mS/cm で脱室菌①と脱室菌②の  $\zeta$  電位は酸性側で pH による影響が見られるが, 脱室菌③は変化が小さい。対イオンが同じ  $\text{Na}^+$  であるため HCl-NaCl-NaOH の系と似た変化になったのだと考える。そのため, HCl-NaCl-NaOH 系での結果も  $\text{HNO}_3\text{-NaNO}_3\text{-NaOH}$  系の結果も硝酸イオンの

含まれる試料水の条件にも当てはめて検討していくことにした。

pH7 で塩濃度を変化させた 3 種類の脱室菌の  $\zeta$  電位を図 10 に示す。pH7 では脱室菌①, ②に比べて脱室菌③が大きな負電荷であることが認められた。脱室菌①と②は鞭毛を持っており, 鞭毛のある脱室菌は自分の運動により接触回数が増えるため凝集しやすく, 球菌より移動度が小さかったと考えられる。

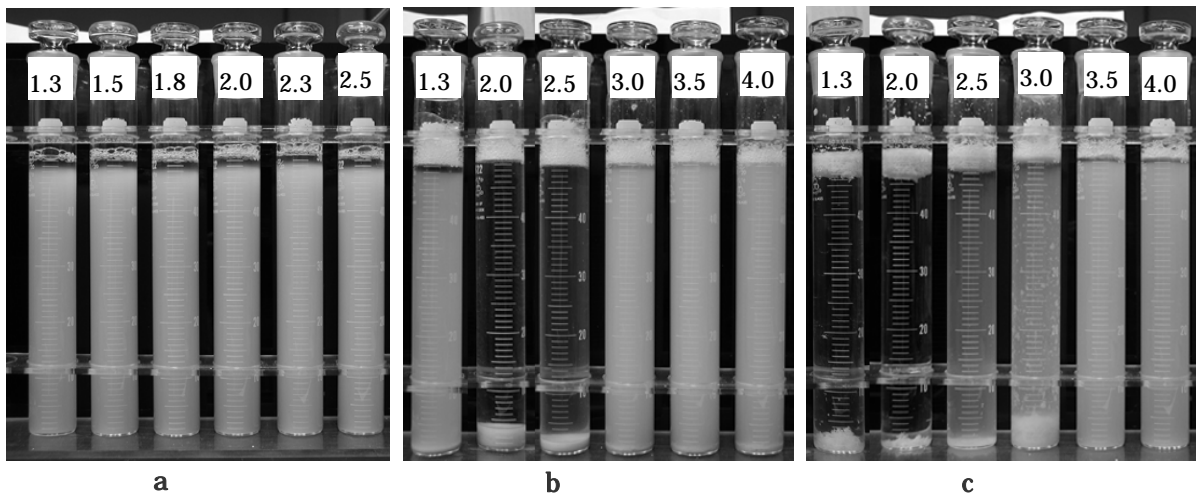


図 7. 3 種類の脱室菌の pH による分散状態の変化. a : 脱室菌①, b : 脱室菌②, c : 脱室菌③. HCl-NaCl-NaOH 系, 電気伝導度 9.6mS/cm, pH1.3~4.0.

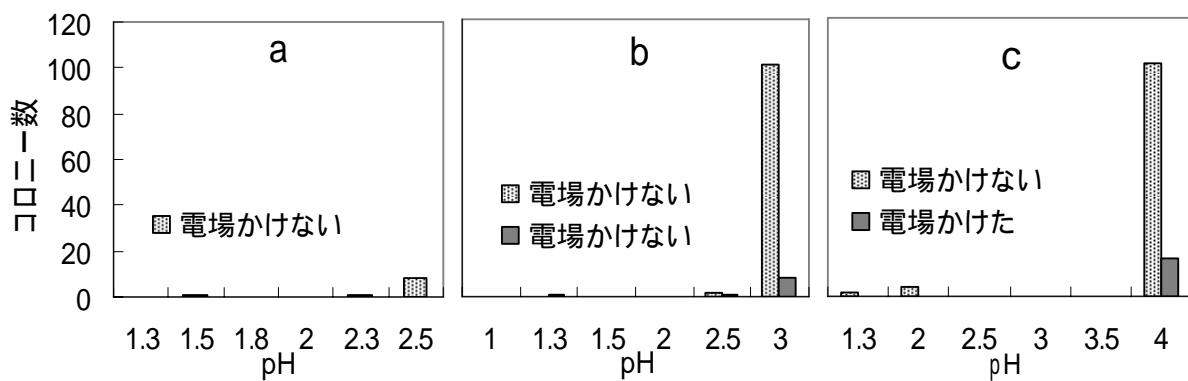


図 8. 3 種類の脱室菌の生存状況. a : 脱室菌①, b : 脱室菌②, c : 脱室菌③

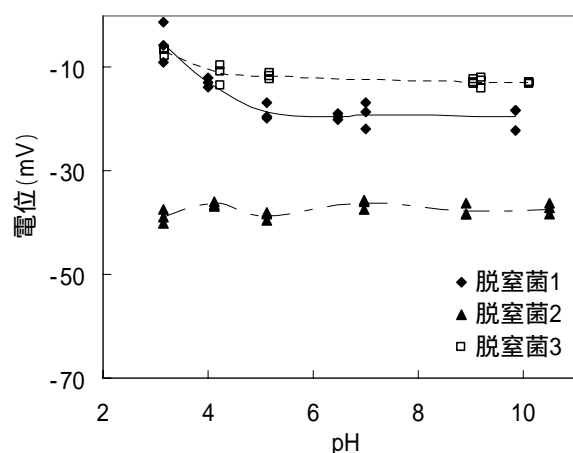


図 9. 3 種類の脱室菌の $\zeta$  電位-pH 曲線.  
HNO<sub>3</sub> Na NO<sub>3</sub>-NaOH 系,  
電気伝導度 12mS/cm.

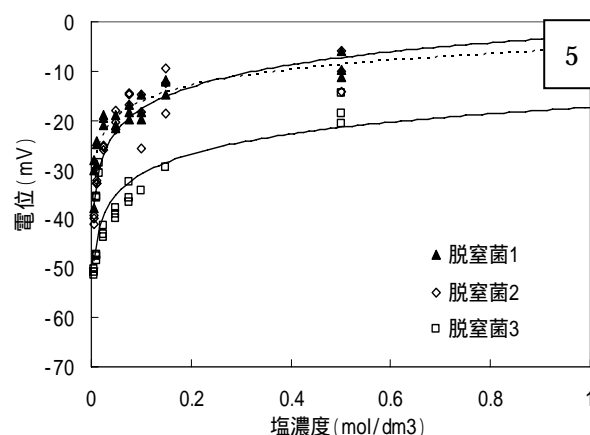


図 10. pH7 で塩濃度を変化させた 3 種類  
の脱室菌の $\zeta$  電位.  
HCl-NaCl-NaOH 系.

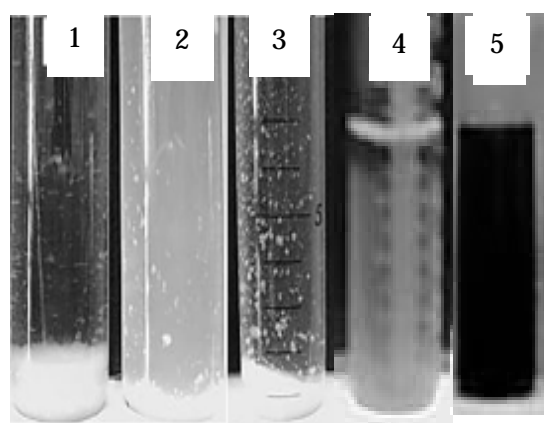


図 11. 分散試験の結果.1 : 第二塩化鉄  
(0.007mol/l), 2 : 硫酸アルミニウム  
(0.045mol/l), 3 : 塩化アルミニウム  
(0.007mol/l), 4 : 塩化カルシウム(0.05mol/l),  
5 : MB(0.005mol/l).

### 3-3. 無機塩類, 陽イオン染料への分散

分散試験の結果を図 11 に示す。第二塩化鉄, 硫酸アルミニウム, 塩化アルミニウムを加えると強く凝集した。陽イオン染料のメチレンブルーにも強い吸着が見られた。塩化ナトリウム, 塩化カルシウム,

塩化マグネシウムなどは大量に加えても強い凝集はしなかった。

これは脱室菌の細胞表面は脂質二分子層の解離基が存在するためだと考えられ, 電解質濃度が高いところでも 0 にならない事と一致する。第二塩化鉄, 硫酸アルミニウム, 塩化アルミニウム, メチレンブルーが多く含まれていると凝集が起こるため脱室効率とは下がると言える。

### 3-4. カチオン界面活性剤への分散

72 時間後の分散状態を図 12 に,  $\zeta$  電位を図 13 に示す。塩化ベンザルコニウムの臨界ミセル濃度はおよそ 0.026% である。脱室菌①と脱室菌②は臨界ミセル濃度以上で凝集し, 脱室菌③は臨界ミセル濃度付近で凝集するが, それよりも高い濃度になると再び分散した。また, カチオン界面活性剤 0% のものと比較し, 塩化ベンザルコニウムを加えたものは沈降が早い。負帯電だった脱室菌はカチオン界面活性剤の増加とともに表面の電荷が中和され, 徐々に負電荷が小さくなり臨界ミセル濃度付近を境に正帯電へと変化している。

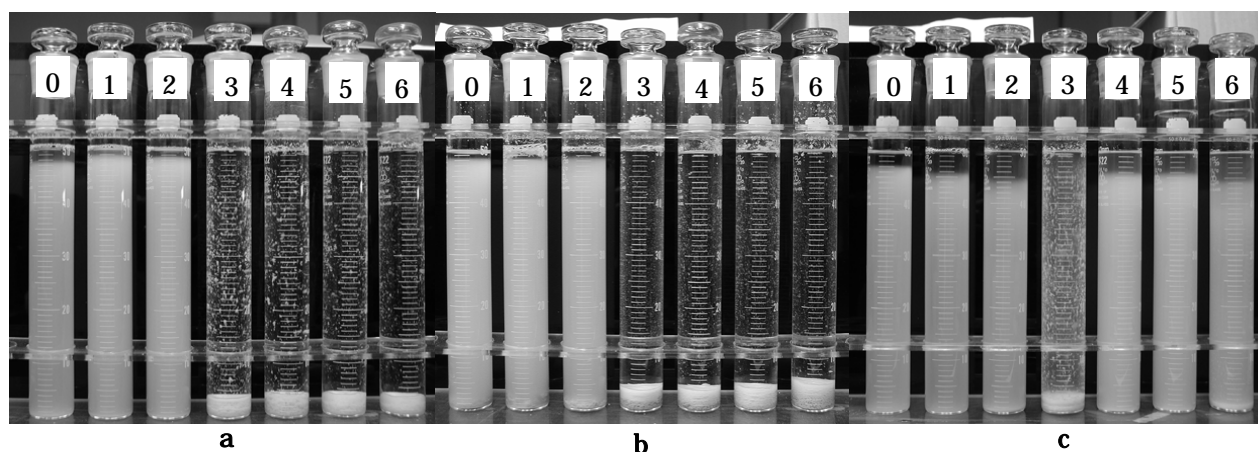


図 12. 3 種類 の 脱 室 菌 の カ チ オ ン 界 面 活 性 剤 へ の 分 散 状 況 ( 72 時 間 後 ) . 0:0%, 1:0.016%, 2:0.023%, 3:0.093%, 4:0.16%, 5:0.23%, 6:0.93% (wt). a : 脱 室 菌 ①, b : 脱 室 菌 ②, c : 脱 室 菌 ③

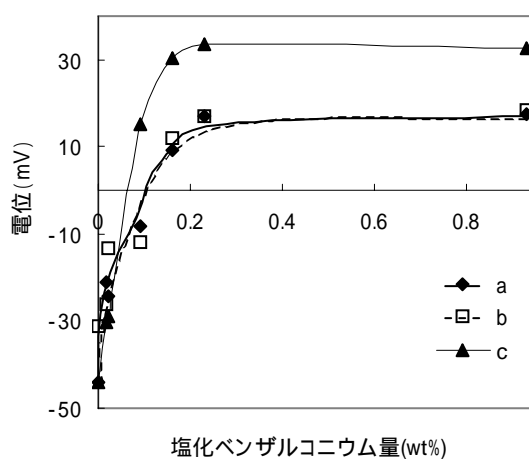


図 13. カ チ オ ン 界 面 活 性 剤 量 -  $\zeta$  電 位 曲 線 . 伝 導 度  $500 \mu S/cm$ , pH7. a : 脱 室 菌 ①, b : 脱 室 菌 ②, c : 脱 室 菌 ③.

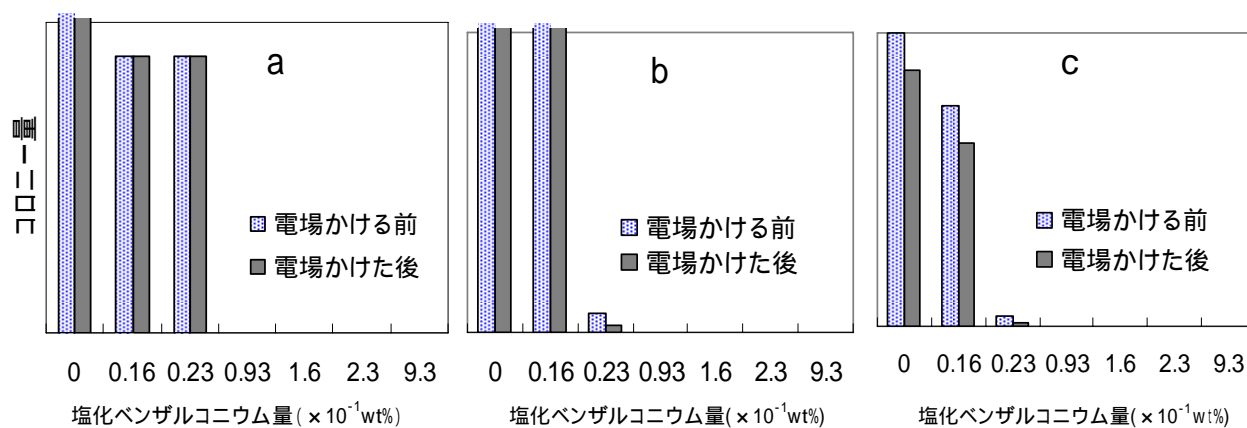


図 14. 3 種 類 の 脱 室 菌 の カ チ オ ン 界 面 活 性 剤 添 加 時 の 生 存 状 況 . a : 脱 室 菌 ①, b : 脱 室 菌 ②, c : 脱 室 菌 ③.



これは、疎水基同士の相互作用により親水基を外側に向けて二分子吸着層が徐々に生じるため、変化が大きい脱室菌③は 0.093%以上で親水基同士の静電反発により再び分散したと推察する。そのため、表面電荷の変化が脱室菌③よりも小さかったと考える。生存状況について図 14 に示す。脱室菌①は塩化ベンザルコニウムの濃度が 0.023%までは同等の生存率だが、0.091%以上で生存しなかった。脱室菌②と③は 0~0.023%にかけて徐々に減少し、0.093%以上で生存しなくなった。脱室菌①は脱室菌②、③よりも塩化ベンザルコニウムに耐性があると推察する。しかし、臨界ミセル濃度以上では 3 種類ともカチオン界面活性剤の殺菌性により死滅する。

### 3-5. 脱室菌の比表面積の測定

図 15 に示すように、脱室菌によるメチレンブルーの吸着量との関係は直線になり飽和吸着点が見られない。高濃度側に飽和吸着点があるとも考えら

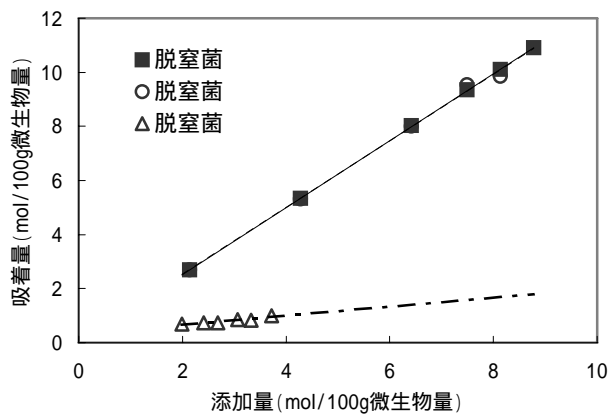


図 15. 脱室菌による MB 吸着量の測定結果.

れるが、メチレンブルーの殺菌作用により死滅するため高濃度では測定できない。そのため脱室菌の比表面積はこの方法では測定できないと言える。図 15 からそれぞれの全表面積は脱室菌①では  $85\text{m}^2/\text{g}$  以上、脱室菌②では  $77\text{m}^2/\text{g}$  以上、脱室菌③では  $7.8\text{m}^2/\text{g}$  以上であり、脱室菌①と②と比べて脱室菌③はメチレンブルーの吸着量が少なく、比表面積が

小さいと推測される。これは脱室菌③が球菌であり、脱室菌①と②の桿菌に比べて小さく、また鞭毛がな

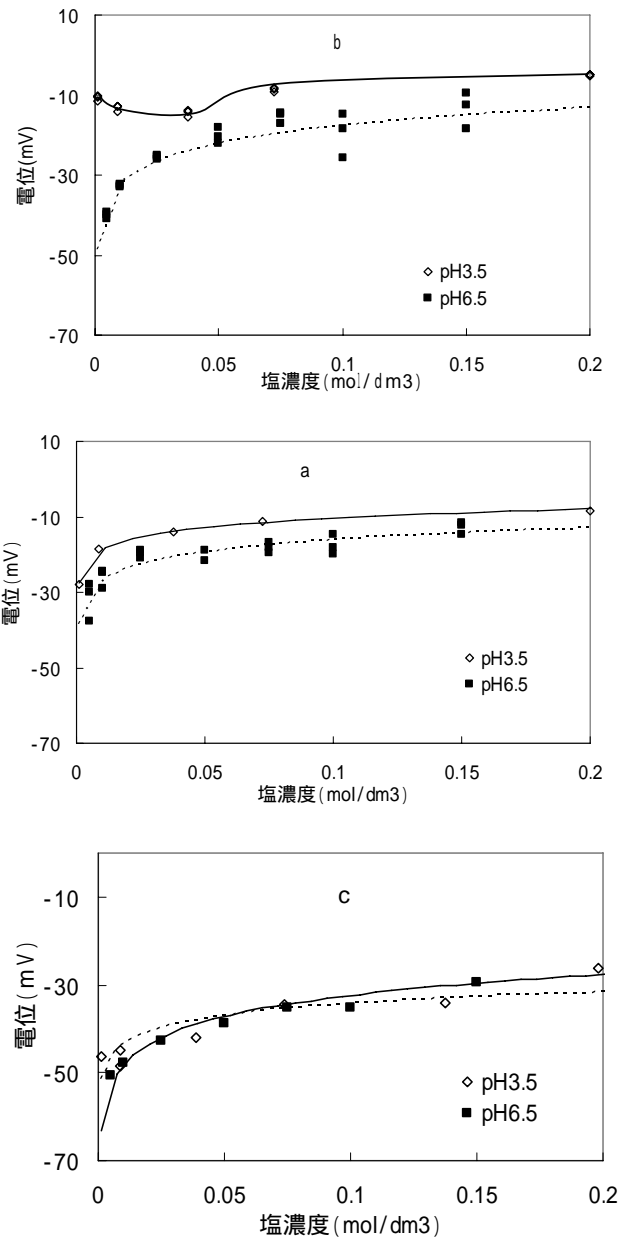


図 16. 3 種類の脱室菌の電位-塩濃度曲線。  
a: 脱室菌①, b: 脱室菌②, c: 脱室菌③, HCl-NaCl-NaOH 系.

いためだと考えた。陽イオン界面活性剤を添加した時に脱室菌③が脱室菌①、②よりも変化が大きかったのは表面積が脱室菌①、②に比べて小さく、中和されるのに必要な陽イオン量が少なかったためである。

### 3-6. 表面電荷層内の電荷の偏り

HCl-NaCl-NaOH の系で塩濃度を变化させた時の電位を図 16 に示す。電解質濃度が濃いところで 0 ではない一定の値をとることから微生物が‘柔らかい表面’<sup>7,8)</sup> であることが分かる。微生物の表面にはリポ多糖があり、この層内には電解質が浸透できるため電解質濃度によって表面電荷層内の表面電荷に起因してくる場所が変わる<sup>7,8,9)</sup>。

脱室菌②は pH6.0 から低い塩濃度と pH 条件下で負の電荷が小さくなった。この変化は表面電荷層内の起因してくる電荷の分布に違いがあると考え。脱室菌①と③は同じように変化しているため表面電荷層内の電荷の分布に違いがないと考える。電荷の分布に違いがあると等電点も濃度によって変化してくるため、濃度によって脱室効率に及ぼす変化も脱室菌②は脱室菌①、③よりも大きいと推察する。

## 4. 結 論

山梨県上野原市で採取、培養した 3 種類の脱室菌について、帯電状態・分散状態を中心に脱室菌のコロイド化学的性質を調べた結果、脱室菌の生存と脱室効率に影響する水質との関係について以下のことが判明した。

(1) 脱室菌による  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NO}_2^-$  ( $\text{mg/dm}^3$ ) の脱室量を脱室処理 41 日めで比較すると、鞭毛を有する脱室菌①が 100%、同脱室菌②が 92% に対し、球菌である脱室菌③は 99% に達した。

脱室条件において脱室菌は③>①>②の順に良好な分散性を示した。また、分散性の高い脱室菌の脱室速度が早かった。

(2) 3 種類の脱室菌ともに pH3~11 では負に帯電し、脱室菌①の等電点が不明瞭であったのに対し、脱室菌②は pH1.5 付近に、脱室菌③は pH2.0 に等電点を示した。

塩濃度が高い条件では分散性が小さくなる。

鞭毛を有する脱室菌①と②と比較して、球菌である脱室菌③の分散性が高かった。脱室菌①は pH2.5

以上で、脱室菌②は pH2.5 以上で生存したが、電場をかけると生存数が減少した。また脱室菌③は pH1.3 でも生存するが電場をかけると pH4 より酸性側では死滅した。

(3) 最も分散性の高い脱室菌③は、NaCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  などの 1 価および 2 価陽イオンの塩を多量に加えても強い凝集はしなかったのに対し、3 価陽イオンの塩である第二塩化鉄、硫酸アルミニウム、塩化アルミニウムの添加により強く凝集した。陽イオン染料のメチレンブルーにも強い吸着が見られた。

(4) 3 種類の脱室菌はカチオン界面活性剤添加により凝集し、特に脱室菌③は臨界ミセル濃度付近を境に電荷の符号が反転して再分散し、臨界ミセル濃度以上では 3 種類とも殺菌された。

(5) 脱室菌によるメチレンブルーの吸着等温線は直線となりこの方法では脱室菌の比表面積は測定できなかった。

(6) 脱室菌②は表面電荷に起因する層内の電荷の分布に違いがあり、塩濃度の変化が及ぼす脱室効率への影響が脱室菌①、②よりも大きいと言える。

**謝 辞** 本研究の遂行にあたり、本学電子顕微鏡室の井上嘉先生には微生物の電子顕微鏡写真撮影をご指導いただきました。深く感謝申し上げます。また環境科学科化学分析室の高橋敏江様には化学分析を含め実験遂行にいろいろとお世話いただきました。厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 社団法人 日本水道協会, 上水試験法 解説編, 社団法人 日本水道協会, 東京, pp244-250, 1993.
- 2) 有馬啓, 田村学造, 生物による環境浄化, 財団法人 東京大学出版会, 東京, pp159-174, 1980.
- 3) 森崎久雄, 服部黎子: 界面と微生物, 学会出版センター, 東京, pp3-4, 1986.
- 4) 上間綾乃: 脱室菌による工業排水中の硝酸イオンの除去, 帝京科学大学大学院修士論文, 山

梨,pp5-6,2005

5) 水島綾子：上野原に棲息する脱室菌の性質と硝酸イオンの除去,帝京科学大学卒業論文,山梨,pp4-5,2006

6 ) Hang,P.T.,Brindly,G.W., : *Clays Clay Miner.*,18,203,Great Britain, pp203-212,1970.

7) 北原文夫,古澤邦夫,尾崎正孝,大島広行：ゼータ電位-微粒子表面の物理化学,サイエンティスト社,東京,pp3-43,1995.

8) 大島広行：柔らかい表面の界面電気現象—電気泳動度の解析— . 表面,30 ( 7 ) : pp564-567,572-574,1992

9) 近藤保：新版 界面科学,三共出版,東京,pp88-92,2001.